

## 研究課題別評価

### 1. 研究課題名:

シグナル伝達機構のシステム解析

### 2. 研究者氏名: 黒田 真也

研究員: 浦久保 秀俊 ( 研究期間 H.15.04~H.18.03 )

### 3. 研究の狙い:

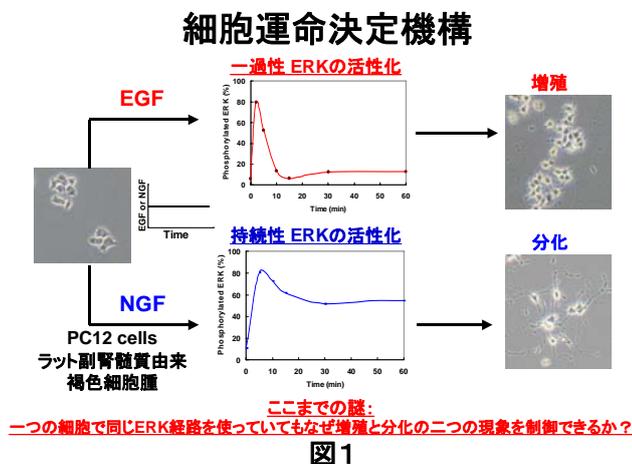
細胞は、外界より与えられた様々な情報(シグナル)に対して、シグナル伝達機構と呼ばれる情報処理機構を用いて、細胞の増殖や分化、神経細胞のシナプス可塑性などのさまざまな生命現象を制御している。このシグナル伝達機構の実体は主に蛋白質等の分子からなる巨大な生化学反応ネットワークである。近年その全貌が明らかになりつつあるが、研究の多くはネットワークや分子の同定といった細分化する方法をとっており、ネットワーク間の協調的作用機構については不明な点が多い。また、シグナル伝達ネットワークには非線形性が存在することがわかっており、細分化するだけの実験手法のみでは全体の挙動を把握することはできない。本研究では、従来の細分化する実験的手法だけでなく、生化学反応に基づいたコンピュータシミュレーションも援用したシステム生物学的手法を用いてシグナル伝達機構の動的特性の解明を試みる。これにより初めてシグナル伝達におけるネットワーク間の協調的情報処理機構の定量的な記述と理解が可能となると期待される。本研究ではシグナル伝達機構のシステムの動的特性を明らかにするために、細胞運命決定機構とスパイクタイミング依存性シナプス可塑性に着目して解析を行う。

### 4. 研究成果:

本研究は、I. 細胞運命決定機構、II. スパイクタイミング依存性シナプス可塑性からなる。以下にそれぞれの項目別に成果を述べる。

#### I. 細胞運命決定機構

ERK を含むシグナル伝達機構は極めて多彩な生命現象を制御する。このように分子ネットワークを用いて異なる作用を制御する点がシグナル伝達機構の本質的な特徴である。このような制御は複数の経路の組み合わせパターンに変換することによって実現されると考えられるが、情報を特定のシグナル伝達機構の時間波形にコードすることによっても同様の制御が可能になる。この中でも特に注目されているのが



PC12 細胞における細胞の増殖と分化の運命決定機構である(図1)。PC12 細胞では同じ ERK 分子が一過性あるいは持続性に活性化することで、それぞれ細胞の増殖あるいは分化という異なる細胞運命を導く。このような問題を解決するためには従来の実験だけでなく、コンピュータシミュレーションを用いた手法が必須であるが、単なる入出力データから情報を抽出してモデルを推定する手法では多くの場合シミュレーションモデルを一意に決定できない。また、実際に個々の文献情報からシミュレーションモデルを作成してもパラメータの計測精度が統一されておらず予測に耐えるモデルは作成できない。したがって、文献情報に基づいたボトムアップ的なシミュレーションモデル構築とカギとなる細胞内の分子ダイナミクス計測を密接にフィードバックさせることによるのみ

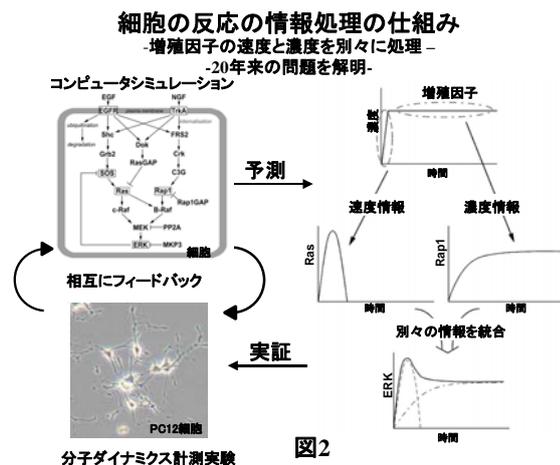
シグナル伝達機構の正しいモデルの作成と定量的な理解が得られると考えられる。このような手法は、特に同じ分子や経路がなぜ異なる作用を遂行できるかという問題に対して非常に強力である。そこで、本研究では PC12 細胞にフォーカスしてカギとなるいくつかの分子のダイナミクスを詳細に計測して、これを正確に再現するコンピュータシミュレーションを作成することにより、細胞全体の反応に対する予測精度を飛躍的に向上することに成功し、この問題を克服した。さらに、コンピュータシミュレーションによる解析から増殖因子の投与速度と濃度をそれぞれ Ras と Rap1 経路が別々に捉えて、一過性と持続性の ERK 分子の活性化波形へ変換していることを予測した。この予測は実験により実証された(図2)。この成果は、20 年以上知られていた現象についてシステムとしての仕組みを初めて解き明かしたものであり、Nature Cell Biology 誌 4 月号に掲載された。

現在、ERK の一過性および持続性の活性化波形が、どのように異なる下流の遺伝子群を介して細胞の増殖および分化といった細胞の運命決定を制御するのかを解析している。

現在、ERK の一過性および持続性の活性化波形が、どのように異なる下流の遺伝子群を介して細胞の増殖および分化といった細胞の運命決定を制御するのかを解析している。

## II. スパイクタイミング依存性シナプス可塑性

生物の脳における記憶や学習は、シナプス伝達効率の活動依存的变化、すなわちシナプス可塑性によって達成される。特にプレ・ポストシナプスニューロンの正確な発火タイミングの違いに依存するスパイクタイミング依存シナプス可塑性 (STDP: spike-timing dependent plasticity)は、神経回路の情報符号化のメカニズムに深く関わっていると考えられることから、大きな注目を集めてきた。しかし、STDP を導くシグナル伝達機構の、システム的かつ定量的な理解は未だなされていない。そこで、我々はシナプス可塑性の入力から出力までを一組の数理モデルで表現し、STDP の生成機序をシステムとして理解することを試みた。すなわち、一連のシナプス可塑性シグナル伝達機構を、膜電位のマルチコンパートメントモデルと生化学反応モデルの組み合わせとしてコンピュータ内に再構築したのだ。その結果、LTP は提案されているシナリオの内の一つに従って再現されたものの、LTD はこれまでに提案された LTD 入力シナリオでは再現できないことが明らか



になった。

そのため、我々は提案されている LTD のシナリオを再検討する必要性に迫られた。スパイクタイミング依存の LTD は VGCC 活性性の  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM が NMDA 受容体を抑圧することがカギになると報告されている。しかし、モデルシミュレーションは VGCC 同様に  $\text{Ca}^{2+}$  流入を導く NMDA 受容体の活性が、スパイクタイミング非依存的に NMDA 受容体を自己抑圧し、VGCC による抑圧を無効にしてしまうことを示した。

この問題を解決する一つの可能性として、我々は、NMDA 受容体に結合する  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM とグルタミン酸 (Glu) のあいだにアロステリック性が存在するのではないかとする仮説を提案した。このアロステリック性は、VGCC 活性性が効果的に NMDA 受容体を抑圧することを可能にし、通常の STDP

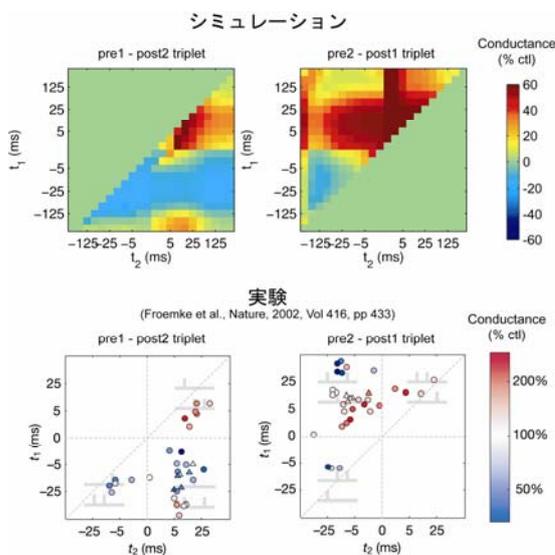


図3

のみならず、より複雑な発火タイミングが決定する Triplet-STDP をも再現することができる。複雑な発火タイミングは同様に複雑な  $\text{Ca}^{2+}$  時間波形を作り出す。複雑な  $\text{Ca}^{2+}$  時間波形に対しても有効な NMDA 受容体のアロステリック性は、LTD のためのスパイクタイミング検知メカニズムとして、もっとも妥当な可能性であると考えられることができる。

このように、システム全体を俯瞰するコンピュータシミュレーションの手法を用いることで、実験による検証の手順の欠損を明らかにし、NMDA 受容体を持つと思われる特徴的なふるまいを予言した。本研究は、コンピュータシミュレーションのみに的を絞ったものであるが、細分化された実験を積み上げることによって描かれたシナリオの本質的な欠損をピンポイントで明らかにし、検証すべき実験を明白に提案できる点において、他の概要的なモデルとは明らかに一線を画し、神経科学の発展に直接貢献できる。さらに、複雑なニューロン発火時系列に対するシナプス可塑性の一般ルールを導出することに道を開くことができる。

## 5. 自己評価:

I. 細胞運命決定機構については、増殖因子から ERK の活性化までの特性を明らかにすることができた。これについてはさきがけ研究期間内に成果を公表することができたので、十分予定通り進展したと考えられる。次の課題である ERK の下流の遺伝子発現を解明して初めて細胞運命決定機構の仕組みを明らかにすることができるが、これについても現在成果が得られており、近いうちに明らかにできると期待される。

II. シナプス可塑性については、シミュレーションモデルの構築を完成して実験結果との整合性を検討することにより、スパイクタイミングを検知するために必要な NMDA 受容体のアロステリック

な特性を予測するところまで進展している。現在のままでも論文としての公表は十分に可能であるが、我々の NMDA 受容体のアロステリックな特性を実験で検証すればシナプス可塑性の基本原理の最後のピースを実証することになり極めてインパクトが高くなるため、その実証を待っての公表を予定している。ただし、実験による実証もそれほど時間を要するわけではないと期待されるので一年以内の公表を目指す。

また、さきがけ研究開始時には、米国から帰国後研究室を立ち上げたばかりであり、ポスドク研究員の参加により初めて上記の研究成果が得られた。おそらく、私だけでなくさきがけ研究を行う研究者の多くは独立後間もないことが予想されるため、ポスドク採用が研究成果の成否を分けることになる。したがって、ポスドク採用については是非継続されたい。

## 6. 研究総括の見解:

シグナル伝達機構と呼ばれる細胞内分子の化学反応ネットワークは、細胞の増殖と分化という生命現象における二つの重要な役割を選択的に制御している。PC12細胞のERK分子の活性化が一過性が持続性かによって機能選択が行われる機構を定量的な観点から理解するため、この細胞の分子ネットワークの数値シミュレーションで予測し実験によって検証することに初めて成功した。これは細胞生物学、発生生物学の進展に大きく寄与したもので高い評価が与えられている。

## 7. 主な論文等:

### 原著論文

1. Ozaki, Y., Sasagawa, S. and **Kuroda, S.** (2005) Dynamic characteristics of transient responses. *J. Biochem.*, review, 137, (6) 659–663
2. Sasagawa, S., Ozaki, Y. Fujita, K. and **Kuroda, S.** (2005) Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat. Cell Biol.*, 7 (4), 365–373
3. Doi, T., **Kuroda, S.**, Michikawa, T., and Kawato, M. (2005) Spike–Timing Detection by Calcium Signaling Pathways of Cerebellar Purkinje Cells in Different Forms of Long–Term Depression. *J. Neurosci.*, 25 (4), 950–961.
4. Urakubo, H., Aihara, T., **Kuroda, S.**, Watanabe, M., and Kondo, S. (2004) Spatial localization of synapses required for supralinear summation of action potentials and EPSPs. *Journal of Computational Neuroscience*, 16 (3), 251–265.
5. Schweighofer, N., Doya, K., and **Kuroda, S.** (2004) Cerebellar Aminergic Neuromodulation: towards a functional understanding. *Brain Research Reviews*, 44, (2–3), 103–116

### 日本語総説

1. 笹川覚、尾崎裕一、黒田真也 (2005) ERK シグナル伝達ネットワークのシステムバイオロジ—、実験医学 増刊 23 巻, No. 4 号:163–169
2. 尾崎裕一、笹川覚、黒田真也 (2005) ERK 経路のダイナミクスのシステム生物学 細胞工学、24巻、5号、600–601

上記以外の論文 3 件、他口頭発表 6 件、出版物 1 件